

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-48776

(P2001-48776A)

(43) 公開日 平成13年2月20日 (2001.2.20)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 6 1 K 7/48		A 6 1 K 7/48	
7/00		7/00	K
			N
			R
9/06		9/06	
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 8 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2000-234812(P2000-234812)	(71) 出願人	500361021 ソシエテ ダングレ コンボゼ ミネロー ゼタマンドマン フランス ポントリユー 22260 ポント リユー ゾーン アンデュストリール
(22) 出願日	平成12年8月2日(2000.8.2)	(72) 発明者	メキデシュール ニコル フランス パンボール 22500 リュ ド ラベンヌ 4
(31) 優先権主張番号	9 9 1 0 0 7 6	(74) 代理人	100065215 弁理士 三枝 英二 (外8名)
(32) 優先日	平成11年8月3日(1999.8.3)		
(33) 優先権主張国	フランス (F R)		

(54) 【発明の名称】 藻類抽出物、その調製方法及びそれを含む化粧品または医薬組成物

(57) 【要約】

【課題】本発明は、浸透保護、抗ラジカル及び抗皮膚老化に有効な化粧品又は医薬組成物を提供することを課題とする。

【解決手段】本発明は、ベタインが豊富な藻類の抽出物、その抽出方法並びに浸透保護、抗ラジカル及び抗皮膚老化の有効成分としての化粧品又は医薬組成物における使用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 褐藻(Pheophyceae) ファミリーの藻類を収穫する工程；

b) 洗浄する工程；

c) 破碎及び微小破碎する工程；

d) 遠心により細胞破砕片を除去する工程；

e) 酸を用いる沈殿及び活性炭上への吸着により分画する工程；

f) HPLCを用いるグリシンベタインの定量分析によりコントロールされる濾過工程を含む方法を用いて得られることを特徴とする藻類のベタインに富む抽出物。

【請求項2】 該方法のa)工程において、藻類がラミナリア オクロロイカ (*Laminaria ochroleuca*) である請求項1に記載の抽出物。

【請求項3】 該方法のe)工程において、酸が塩酸である請求項1に記載の抽出物。

【請求項4】 f)工程において、濾過が1000Dのカットオフ閾値 (cut-off threshold) を有するタンジェンシャル濾過 (tangential filtration) である請求項1に記載の抽出物。

【請求項5】 グリシンベタインを少なくとも10%含むことを特徴とする請求項1に記載の抽出物。

【請求項6】 化粧品又は医薬用途の組成物における有効成分としての、請求項1～5のいずれかに記載の藻類抽出物の使用。

【請求項7】 浸透保護有効成分としての、請求項6に記載の使用。

【請求項8】 抗ラジカル有効成分としての、請求項6に記載の使用。

【請求項9】 皮膚の抗老化有効成分としての、請求項6に記載の使用。

【請求項10】 請求項1～5のいずれかに記載の抽出物を1～40%含有することを特徴とする、クリーム、ジェル、エマルジョン又は乳剤(milk)タイプの化粧品又は医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ベタインに富む藻類抽出物、その抽出方法並びに化粧品及び医薬組成物における有効成分としてのその使用に関する。

## 【0002】

【従来の技術及びその課題】特に汚染、温度変化、湿度変化のために、及びより特別な環境下で、海水に長い間接触したり太陽に晒されたことによる、主として外部環境の活動的な影響から皮膚の保護を確実にする組成物を提供することが、化粧品の製造業者の不变の目的である。

【0003】種々の有効成分は、好ましくは天然の、野菜又は動物起源において探し求められている。実際、ストレスの各種の条件に対して細胞保護に寄与するいくつ

かの分子が、天然に見い出されている。これらの中で、ベタインは、ホメオスタシスを維持し、特に浸透性ストレスから細胞内環境を保護する役割を果たすことが知られている(特に、Petroniniら *Biochem. J.* 282, 1992, 69-73 及び Sutherlandら, *J. Bacteriol.*, 168, 1986, 805-814 参照)。

【0004】これらの分子は、動物及び植物界の双方において、又はバクテリア及びプランクトンにおいて、見い出されている。

【0005】それらは、浸透圧の変化を受ける藻類、特に波との接触および出現を交互に受ける藻類の場合に豊富にある。

【0006】これが、本出願人が、特に化粧品工業にとって潜在的に興味のある分子を探索するために、ブリタニーの海岸において多量の褐藻(Pheophyceae)ファミリーの褐藻類を利用した理由である。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本出願人は、特にラミナリア オクロロイカ (*Laminaria ochroleuca*) として知られる藻類の抽出物を調製すること及び工業的スケールで実行するのに容易な方法を用いて該抽出物をベタインファミリーの物質で豊富にすることに努力した。

【0008】本発明の方法は、

a) 新鮮な藻類を収穫する工程；

b) 該藻類を洗浄する工程；

c) 破碎及び微小破碎する工程；

d) 遠心により細胞破砕片を除去する工程；

e) 酸、好ましくはHClを用いる沈殿及び活性炭上への吸着により分画する工程；

f) HPLCを用いるグリシンベタインの定量分析よりモニターされ、濾液のグリシンベタイン濃度が12.5%に到達したときに停止する濾過工程(この濾過は、好ましくは1000Dのカットオフ閾値でのタンジェンシャル濾過(tangential filtration)であることを包含する)。

## 【0009】

【発明の実施の形態】かくして得られる抽出物は、少なくとも10%を示すグリシンベタイン濃度に関して標準化されており、原料物質源がコンブ属(*Laminaria*)であることから、ラミナイン (Laminaine) と呼ばれるだろう。

【0010】浸透保護剤としてのベタインの公知の性質に加えて、本出願人は、細胞膜及び細胞外マトリクス(プロテオグリカン類及びグリコサミノグリカン類)の構成要素の新合成(neosynthesis)についての、抗ラジカル効果及び刺激効果を明らかにした。本出願人は、本発明の藻類抽出物を特に化粧品用途の組成物の有効成分としての使用を企図してこれらの予測できない性質を利用した。

【0011】藻類抽出物の異なった性質は、本出願人に

より明らかにされ、これは以下に示す実施例から明らかになるが、実際には皮膚のコンディションを改善するためおよびフリーラジカル放出の原因となる及び／又は皮膚再生を減速して老化を促進するストレスの様々なコンディションに対する抵抗性を改善するために、特に本発明の抽出物を使用することを予期できる。

【0012】このように、本発明は、化粧品組成物又は医薬組成物において、上記藻類抽出物を、特に浸透保護、抗ラジカル及び抗皮膚老化の有効成分として使用することに関する。

【0013】該有効成分は、クリーム、ジェル、エマルジョン又は乳剤(milk)タイプのいかなる化粧品組成物及び医薬組成物に混合するために使用できる。

【0014】本発明は、また、上記藻類抽出物を1~40%含有する化粧品組成物又は医薬組成物に関する。

【0015】同一の有効成分は、下記に示す方法と類似の抽出方法を用い、他の植物からも抽出され得る。

【0016】本発明の目的はまた、それを含む任意の植物から抽出された上記有効成分を、フリーラジカルに対して保護する有効成分として及び／又は皮膚の抗老化トリートメントとしての使用に括がる。

【0017】以下の実施例は、本発明の範囲を限定することなく、本発明を説明する。

【0018】実施例1：抽出プロセス

ラミナリア・オクロロイカ・アルガ(Laminaria ochroleuca alga)は、ブリタニー(Brittany)の北部海岸で、5月から9月の間に収穫された。

【0019】収穫された藻類は、容器中の海水中で移される。それらは、製造サイトに着くと直ぐに、処理される。

【0020】それらは、ウルシェル(Urschell, 登録商標)型のブレードクラッシャー中で、破碎され、100~200 $\mu$ mの範囲のサイズの粒子にされる。

【0021】破碎された材料は、グリコール含有(50%)脱イオン水中に、溶液1リットル当たり破碎物430gの割合で、懸濁される。

【0022】より微細な破碎は、細胞の内容物を放出させるために、ウルトラチュラックス(Ultra Turax, 登録商標)型のブレードホモジナイザーを用いて、常温で3時間行われる。

【0023】破碎された材料は、細胞破砕片を除去するために、16000gで45分間遠心分離された。上清を回収し、当初の容量の3分の1にまで真空濃縮する。

【0024】次いで、蒸留水中で1/20に希釈し、それにpHを1.0とするための3.5% HCl、及び4%の活性炭を加え、そして30分間マグネティックスターラーによる攪拌に供した。

【0025】酸の添加により多数の望ましくない物質(特にタンパク質)を沈殿させることができ、又活性炭は種々の有機物質(フェノール型物質等)を吸着する。

【0026】次いで、その上清は、1000Dのカットオフ閾値(cut-off threshold)でタンジェンシヤル濾過(tagential filtration)することにより、ペタイン類を濃縮する。清澄な濾液を集めて、Zamarrenoの方法(J. Agricultural and Food Chemistry, 45,3:774-776)に従って、UV検出器を備えたHPLCクロマトグラフィーを用いて分析した。

【0027】標準として、精製したグリシン-ペタイン(シグマ社)の0.2、0.4、0.8及び2重量%の蒸留水溶液を用いて、20倍希釈して、検量線を作成する。

【0028】藻類抽出物試料は、そのクロマトグラフィーピークの表面を標準曲線と比較して、測定される。

【0029】濃縮工程は、グリシン-ペタイン濃度が12.5 $\pm$ 2.5%に達したときに停止した。かくして得られた抽出物を、以下の例において、「ラミナイン(Laminaine)」と称する。

【0030】実施例2：抗ラジカル効果の証明

ラミナインが抗ラジカル効果を有しているという事実は、皮膚生検から培養されたヒト真皮の繊維芽細胞におけるマロンジアルデヒドを定量的に分析することにより、証明された。試験は、第二代から第四代の培養の間の培養物について行われる。

【0031】マロンジアルデヒド(MDA)定量分析：脂質過酸化指数(Liperoxidation index)。

【0032】繊維芽細胞は、多数のマルチウエルディッシュ(各24ウエル)に、10%牛胎児血清、10mMのL-グルタミン及び80 $\mu$ lのゲンタマイシンが補足されたRPMI 1640培養培地1ml中に、ウエル当たり10<sup>5</sup>個の細胞の割合で、分配された。それらは、次いで、CO<sub>2</sub>インキュベータ中で24時間維持された。

【0033】ラミナインは、1用量につき3ウエルの割合で、マルチウエルディッシュに異なる濃度(純品、1/2、1/5及び1/10)で分配された。種々の試験が、並行して行われた：

—3ウエルは、溶媒のみを受けた；

—3ウエルは、SOD(スーパーオキシドディスムターゼ)及びカタラーゼを受けた(ネガティブコントロール)；

—3ウエルは、キサンチン-ヒポキサンチンコンプレックスを受けた(防御酵素の効率の試験(SOD+カタラーゼ))；

—12ウエルは、キサンチン-ヒポキサンチンに加えて、ラミナインの4種の希釈物を受けた；

—12ウエルは、ラミナインの4種の希釈物を受けた。

【0034】マロンジアルデヒドの抽出

細胞のトリプシン処理(trypsinisation)及び遠心分離後、細胞ペレットを下記中に懸濁した：

—250 $\mu$ lの50mMトリス緩衝液、pH8、0.1

MのNaCl含有；

-20mM EDTA

-25 $\mu$ lの7%SDS

-300 $\mu$ lのHCl (0.1N)

-38 $\mu$ lの1%リンタングステン酸水溶液

-300 $\mu$ lの0.67%チオバルビツール酸水溶液  
50℃の暗所で1時間インキュベーション後氷水中で冷却し、各チューブに300 $\mu$ lのn-ブタノールを加えた。これらを、0℃、100,000gで10分間遠心分離した。上相をMDA定量分析のために回収した。

【0035】マロンジアルデヒド定量分析

MDAは、下記HPLCを用いてMDA-TBAコンプレックスを分離後、蛍光を測定することにより、定量的に分析された。

【0036】-モデル2.200ビショフ (Bischoff) ポンプ

-モデルアルコット (Alcott) オートサンプラー自動インジェクター

-C18ウルトラセップ (Ultrasep) カラム (30cm  $\times$  0.18cm)、多孔度 (porosity) 6 $\mu$ m

-蛍光検出器、ジャスコ (Jasco) 821-F1。

10

\*【0037】蛍光検出は、励起515nm及び発光553nmで行われた。使用した溶出液は、メタノール：水、40：60 (v/v) からなり、そのpHは1MのKOHで8.3に調整された。

【0038】定量は、ICSソフトウェアパッケージ (ピック (Pic) 3) (インストルメンテーション、コンソムマブルサービス (Instrumentation, Consumable Service)) を用いて、同様に処理した標準試料 (0.125；0.25；0.5；1 $\mu$ M) と関連させて、行われた。

【0039】タンパク定量分析

タンパクの定量分析は、ブラッドフォード (BRADFORD) 法を用いて行われた。595nmの吸光度の増加は、ユニカム (UNICAM) 8625分光光度計を用いて測定されたタンパクの濃度に比例する。

【0040】結果-細胞ホモジネート中のマロンジアルデヒドの定量分析

1-生理的な脂質過酸化

【0041】

【表1】

ラミナイン	MDA ( $\mu$ M/ mg タンパク)	MDAの減少%
コントロール0	618 $\pm$ 58	-
純品	558 $\pm$ 19	-5
2/2希釈	556 $\pm$ 76	-10
1/5希釈	481 $\pm$ 65	-22
1/10希釈	467 $\pm$ 69	-24

【0042】ラミナインの存在下、特に1/5～1/10希釈において、生理的な脂質過酸化に対する顕著な防御が認められた。

【0043】2-誘導された脂質過酸化

この分析の目的のためには、ラミナイン純品又は1/2※

※希釈の生理的なMDQの有意でない減少の観点から、1/5及び1/10希釈のみが使用された。

【0044】

【表2】

試薬	MDA ( $\mu$ M/ mg タンパク)	MDAの減少%
コントロール	656 $\pm$ 39	-
Sod-Cat	418 $\pm$ 49	-36
Xant-Hypox	1156 $\pm$ 174	+76
SOD-Cat-Xant-Hypox	806 $\pm$ 71	-30
1/5-Xant-Hypox	804 $\pm$ 24	-30
1/10-Xant-Hypox	460 $\pm$ 25	-60

【0045】ラミナインが、キサンチン/ヒポキサンチンのフリーラジカルを生じる系により起こる脂質過酸化に対して、1/5及び1/10希釈において、相当な防御を与えること、それは公知の防御酵素のSOD-カタラーゼにより与えられる防御と少なくとも同程度であることが、認められた。

【0046】用いられた実験条件下で、ラミナインは、このように、培地中で24時間の接触後、ヒト繊維芽細胞★50

★胞上で、有意な抗ラジカル活性を有している。

【0047】実施例3-培養物中の線維芽細胞によるプロテオグリカン及びグリコサミノグリカン合成刺激の実証

ヒト皮膚の生検から得た線維芽細胞を、培地中にまき、2～4継代によって増倍させ、10%ウシ胎児血清、10mM L-グルタミン及び80 $\mu$ g/ml ゲンタマイシンを添加した10mlのRPMI 1640培養培地を含む多数の25cm<sup>2</sup>のディッシュ

に $10^5$ 個/mlの割合で分配させた。その後、CO<sub>2</sub> インキュベータ中24時間維持した。

【0048】ラミナインを種々の濃度(1/2、1/5及び1/10希釈)で、1用量当たり3ディッシュに基づき、各ディッシュに分配した。同時に、3つのディッシュには水のみを加え、コントロールの目的で使用した。

【0049】ラミナインで前処理した細胞の放射性前駆体を取り込み能力(capacity)を調べるために、パルス技術を採用した。放射性前駆体である(<sup>3</sup>H)-グルコサミンを、細胞の回収前18時間に培養物中に加えた。

細胞-生成物接触時間は37℃で24時間であった。

【0050】培地を吸引によって除去した後、細胞を無血清培地で2度洗浄し、取り込まれなかった放射能を除去し、その後、支持体から培養物の表面をこすることによって、剥離させた。細胞をもう一度、培地で洗浄し、その後、600gで5分間遠心した。以下の操作をこの細胞ペレットについて行った。

【0051】-FPLC(ファースト蛋白液体クロマトグラフィー(Fast Protein Liquid Chromatography))を用いたプロテオグリカンの定量分析

-総グルコサミノグリカン(GAGs)の新合成(neosynthesis)

-総蛋白の定量分析

-選択的消化によるグルコサミノグリカンの特徴付け。

【0052】-抽出

膜プロテオグリカン

ペレットの第1画分をデオキシリボヌクレアーゼ(50 U/ml)及びプロテアーゼインヒビターを含む1M NaCl中に懸濁液に置き換えた。その後、ホモジネートを4℃で2時間インキュベートした。12000gで30分間遠心して、膜周囲の(perimembrane)プロテオグリカンを含む第1のホモジネートを得た。該ペレットを用いて他の2種のコンポーネントからプロテオグリカンを抽出した(C1)。

【0053】膜貫通(Trans-membrane)プロテオグリカン第1抽出工程から得られたC1ペレットを、4% デオキシコール酸ナトリウムを含む0.1% アジ化ナトリウム溶液に再懸濁させ、75mVで20秒間超音波処理し、その後、4℃で2時間インキュベートした。膜貫通プロテオグリカンを含む第二の上清を、12000gで30分間遠心することによって得た。該ペレットを用いてマトリクス・コンパートメントからプロテオグリカンを抽出した(C2)。

【0054】マトリクス・プロテオグリカンペレットC2を0.1% アジ化ナトリウム溶液で3回洗浄し、その後、攪拌しながら4M HCl グアニジン、0.1% トリトンX-100及びプロテアーゼインヒビターを含む50mM 酢酸ナトリウムバッファー中の懸濁液に置き換えた。

【0055】マトリクスプロテオグリカンを含む第三の上清を、12000gで30分間遠心することによって得た。

【0056】2-FPLCを用いた精製

FPLCを用いて精製する前に、3種の上清の各々を3倍の容量の100%純エタノール中4℃で終夜沈殿させ、その後、12000gで30分間遠心した。得られたペレットを、50mM Tris-HClバッファー、pH7.4に再懸濁させた。

【0057】同様な分析プロトコルを3試料について行った。

【0058】陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた。これは、実際に、それらのグリコサミノグリカン鎖によりプロテオグリカンに供給された高密度の負の荷電によって促進された。

【0059】各ペレットを、250mlの50mM Tris-HClバッファー、pH7.4に再懸濁させた。DEAE-Sepharose gel CL-6B(ファルマシア)を、K10/40カラム(ファルマシア)にそそぎ入れた。この陰イオン交換ゲルは高い分離能及び高収率を与える。各試料100μlを注入した；溶出の後、波長280nmの分光蛍光計で検出した。

【0060】プロテオグリカンを含むピークを1M NaClで溶出した。

【0061】3-定量分析

放射能測定を パッカード(Packard)(Flo-one)カウンターを用いてHPLCからの出口で行った。

【0062】4-選択的分解を用いた同定  
画分中に存在するGAGsの性質を決定するために、異なる分解反応を行った。

【0063】ACコンドロイチナーゼによる消化  
ACコンドロイチナーゼは、グルクロン酸を解重合させ、その結果、コンドロイチン硫酸を分解する。

【0064】GAGsの凍結乾燥した材料のアリコートを、ACコンドロイチナーゼ(0.2U/ml)を含むTris-HClバッファー、pH8中37℃で1時間インキュベートした。反応を-20℃で凍結することによって停止させた。

【0065】ABCコンドロイチナーゼによる消化  
ABCコンドロイチナーゼは、グルクロン酸及びイズロン酸を解重合させ、その結果、コンドロイチン硫酸及びデルマタン硫酸を分解する。

【0066】GAGsの凍結乾燥材料の第二のアリコートを、ABCコンドロイチナーゼ(0.5U/ml)を含む同じTris-HClバッファー、pH8中37℃で1時間インキュベートした。反応は-20℃で停止させた。

【0067】亜硝酸による消化  
亜硝酸溶液を、硝酸ナトリウム(0.148M)及び酢酸(3.6M)を混合することによって調製した。

【0068】亜硝酸は、アミノスルホネート基を有するグルコサミン結合から、2位でグルコシド結合を切断する；その結果、これはヘパリン及びヘパラン硫酸に特異的である。

【0069】反応は、周囲温度で80分間行った；それは、1M 硫酸アンモニウムを添加することによって停止させた。加水分解物は、乾燥蒸発させ、その後、分析のために50mM Tris-HCl溶液に再置換させた。

【0070】CL.6Bゲル（ファルマシア）上でのGAGsの分離

このゲルは、低分子量の分子を研究するのに適している。50mM Tris-HClバッファー、pH7.4によって平衡化させ、K 10/40カラム（ファルマシア）にそそぎ入れた。\*

\* 溶出は、0.35M NaClを含む同じバッファーを用いて行った。1ml画分を集め、5mlのシンチレーティング液を添加後、カウントした。

【0071】

【表3】

**放射能測定の結果：プロテオグリカンの新合成における効果**

**－膜周囲のプロテオグリカン**

ラミナイン	Cpm	%取り込み
コントロール0	155 ± 32	-
1/5 に希釈	208 ± 25	34
1/10 に希釈	215 ± 12	38

**－膜プロテオグリカン**

ラミナイン	Cpm	%取り込み
コントロール0	170 ± 25	-
1/5 に希釈	253 ± 12	48
1/10 に希釈	285 ± 17	67

**－マトリクスプロテオグリカン**

ラミナイン	Cpm	%取り込み
コントロール0	135 ± 25	-
1/5 に希釈	170 ± 43	25
1/10 に希釈	154 ± 19	14

【0072】このように、我々は、ラミナイン存在下でのプロテオグリカンの新合成の有意な刺激を観察する。\*

※【0073】

【表4】

**新合成したグリコサミノグルカンの特徴付けの結果**

**－デルマトン硫酸及びヘパラン硫酸の新合成（DS及びHS）**

ラミナイン	Cpm	%取り込み
コントロール0	256 ± 24	-
1/5 に希釈	263 ± 43	0
1/10 に希釈	308 ± 21	20

**－デルマトン硫酸及びコンドロイチン硫酸の新合成（DS及びCS）**

ラミナイン	Cpm	%取り込み
コントロール0	538 ± 85	-
1/5 に希釈	558 ± 73	-
1/10 に希釈	498 ± 103	-

**－ヘパラン硫酸の新合成（HS）**

ラミナイン	Cpm	%取り込み
コントロール0	304 ± 23	-
1/5 に希釈	345 ± 65	-
1/10 に希釈	398 ± 38*	30

【0074】結論として、1/5及び1/10に希釈したラミナインは、培養物中のヒト線維芽細胞のマトリクス構成成分の新合成に、有意な作用を示す。

【0075】得られた結果は、実際に、各々膜（67%）、膜周囲（約34%）及びマトリクス（1/5に希釈の場合で25%）におけるプロテオグリカンの新合成の有意な刺激を示している。

【0076】同時に、DS/HS及びDS/CS対及びHSの定量分析によって、細胞膜の領域中に特に存在するヘパラン硫★50

★酸の産生を刺激（1/10に希釈した場合30%）することが判明した。細胞レベルでのPGsの存在は、細胞及び細胞外マトリクスの代謝において主要な効果を有する。これらPGsは、それらの局在によって、種々のタイプの細胞－リガンド、細胞－細胞及び細胞－マトリクスの相互作用を引き起こし得る。

【0077】実施例4－培養物中の線維芽細胞によるコラーゲン合成刺激の証明  
線維芽細胞を実施例3と同様の条件下に培養物中にま

く。

#### 【0078】細胞のプレインキュベーション

プレインキュベーションの目的は、血清因子の減少を通して細胞の活性を低下させることによって、細胞を細胞周期のG1期又はG0期に同期させることである。コンフルエンス段階に達した後、培地を除去し、0.5%のFCSが添加されたRPMI培地に置き換える。プレインキュベーション時間は24時間続ける。

#### 【0079】細胞インキュベーション

細胞インキュベーションが終わると、培地を除去し、全ての痕跡量の血清成分を除去するために、FCSを含まないRPMI培地で細胞層をリンスする。インキュベーション操作は、0.28 mmole/lの濃度のビタミンC又は、種々の希釈度のラミナインを添加した培養培地で行う。

【0080】使用されたビタミンCの濃度は、コラーゲンの分泌だけでなくヒドロキシル化酵素を活性化するのに最適である。0.2mmole/lの濃度のβ-アミノプロピオニトリルもまた、リシル-オキシダーゼ酵素を阻害することによって、培養培地中にフィブリルの形で新合成コラーゲンが析出するのを防ぐために添加される。

【0081】インキュベーション時間(24時間)の終わりに、培養培地を回収し、細胞層をリンスする。

【0082】HPLCを使用したヒドロキシプロリンの定量分析

#### ー方法の原理

アミノ酸類は、オフトアルデヒドアシッド (ophtaldehyde acid; OPA) で誘導され、その干渉を除く。ヒドロキシプロリン及びプロリンは、アミノ基をNBD-Clに結合させることによって、NBD-Clで誘導される。NBD-Hpを逆相HPLCを用いて分離し同定する。アミノ酸誘導体の分離を調製するために、ヒドロキシプロリンを含有するスタンダードを最初にNBD-Clに結合させた。

#### ー材料

ヒドロキシプロリンは、逆相HPLCを用いて分離した後、蛍光を測定することにより定量化する。

\*ーモデル2.00ビショフ (Bischoff) ポンプ

ーアルコットモデル (Alcott Model) 788オートサンブラ

ータイプ自動インジェクター

ーウルトラセプ (Ultrasep) C18カラム (30cm×0.18cm)、多孔度 (porosity) 6μm

ー蛍光検出器、ジャスコ (Jasco) 821-FI

ークロマトグラフィー条件: 移動相は、アセトニトリル/リン酸ナトリウムバッファー混合物、0.1 mol/l, pH7.2 (9:91v/v) によって構成される; 流速を1ml/分にセットする; 溶離は定常モード (stationary mode) で行われ、サイクルは10分続く。移動相は予め過され、使用前に脱気される。

ー試薬の調製

NBD-Cl=25mmoleをメタノールに溶解する。

【0083】OPQ=メタノール中に150mmole

バッファー=0.4mmole/l; pHを7.2に調整する

ヒドロキシプロリンの水溶液 (50mg/l)、及び0.5から40mg/lの範囲の濃度を得るために希釈される。

ー標準範囲

10μlの種々濃度の標準溶液を10μlのバッファー (pH 9) と混和する。5μlのOPAを添加して攪拌した後、チューブを周囲温度で5分間維持する; 次に、10μlのNBD-Cl溶液を添加する。反応は、遮光下で60°Cで3分間行う。そしてチューブを氷中に置く。得られた着色はオレンジ色で、遮光下では少なくとも3時間は安定である。この混合物50μlを注入する。サンプリングカーブは直線である。

【0084】培養培地のサンプルを同様に処理し、試験を3回繰り返す。

ー結果

ヒドロキシプロリンの分離及び同定は、逆相HPLCを使用して行われた。蛍光ピークは、積分後、培養培地中のヒドロキシプロリン濃度を計算するために使用された。

【0085】

\* 【表5】

	ヒドロキシプロリン 濃度 mg/ml	増加 (%)
コントロール 0	3.67 ± 1.18	-
コントロール+ビタミンC	5.25 ± 1.31	43
1/5 に希釈	9.72 ± 1.32	164
1/10 に希釈	8.64 ± 0.98	135

【0086】1/5及び1/10に希釈されたラミナインは、コンフルエントなヒト繊維芽細胞において、コラーゲン合成及びヒドロキシル化酵素の活性化に最適の濃度で使

\*用されたビタミンC (43%) によって誘導されるよりもコラーゲン新合成の増加が大きいことが認められた。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード(参考)
A 6 1 K 9/107		A 6 1 K 9/107	
35/80		35/80	Z
A 6 1 P 17/00		A 6 1 P 17/00	
43/00	1 0 7	43/00	1 0 7